



⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 58 588 A 1**

⑤ Int. Cl. 7:
C 07 H 21/00
C 07 H 21/04
C 12 Q 1/68
G 01 N 33/52

⑲ Aktenzeichen: 198 58 588.8
⑳ Anmeldetag: 18. 12. 1998
㉔ Offenlegungstag: 24. 2. 2000

⑥⑥ Innere Priorität:
198 38 213. 8 22. 08. 1998

⑦① Anmelder:
Sauer, Markus, Dr.rer.nat., 69124 Heidelberg, DE;
Wolfrum, Jürgen, Prof. Dipl.-Phys. Dr., 37124
Rosdorf, DE

⑦④ Vertreter:
Zenz, Helber, Hosbach & Partner, 45128 Essen

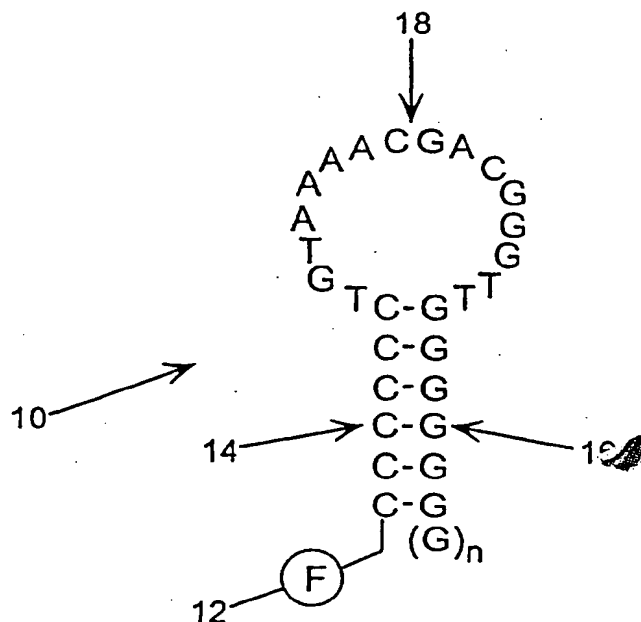
⑦② Erfinder:
gleich Anmelder

⑤⑤ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:
WO 98 02 449 A1
Chemical Abstracts:
Vol.130, 1999, Ref. 262688;
Vol.130, 1999, Ref. 247503;
Vol.130, 1999, Ref. 11085k;
Vol.129, 1998, Ref.286496v;
Vol.129, 1998, Ref. 23799p;
Vol.128, 1998, Ref. 85094t;
Vol.128, 1998, Ref.163303b;
Vol.126, 1997, Ref.259686p;
Vol.122, 1995, Ref. 3220v;
Vol.121, 1994, Ref.225476b;
Vol. 96, 1982, Ref. 63552j;
Vol.124, 1996, Ref.251968v;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ Farbstoffmarkiertes Oligonukleotid zum Markieren eines Nukleinsäuremoleküls

⑤⑦ Ein Oligonukleotid (10) dient als Nukleinsäuresonde. Es besteht aus einem Schleifenabschnitt (18), der eine zu einer Zielsequenz eines Nukleinsäuremoleküls komplementäre Schleifensequenz aufweist, sowie aus beiden Enden des Schleifenabschnitts (18) angeordneten Stielabschnitten (14, 16), die miteinander hybridisieren können, um das Oligonukleotid (10) zu einer Schleife zu schließen. Nur einer der Stielabschnitte (14) ist mit einem Fluoreszenz-Farbstoff (12) markiert. Der andere Stielabschnitt (16) enthält Guanosin (6). Guanosin löscht die Fluoreszenz des Farbstoffs (12) durch photoinduzierten Elektronentransfer, sofern Farbstoff (12) und Guanosin (6) sich in hinreichender räumlicher Nähe befinden. Dies ist gegeben, wenn die Stielabschnitte (14, 16) miteinander hybridisieren und das Oligonukleotid (10) zu einer Schleife schließen. Hybridisiert dagegen der Schleifenabschnitt (18) mit dem Zielsequenzabschnitt, so öffnet sich das Oligonukleotid (10), was den Abstand zwischen Farbstoff (12) und Guanosin (6) vergrößert. Das Oligonukleotid kann dann durch seine Fluoreszenz nachgewiesen werden, deren Stärke ein spezifisches Maß für das Vorhandensein von Nukleinsäuremolekülen mit der Zielsequenz ist.



DE 198 58 588 A 1

DE 198 58 588 A 1

Die Erfindung bezieht sich auf ein farbstoffmarkiertes Oligonukleotid zum Markieren eines einen Zielsequenz-Abschnitt aufweisenden Nukleinsäuremoleküls, wobei das farbstoffmarkierte Oligonukleotid folgende Komponenten aufweist: einen Schleifenabschnitt, der eine zur Zielsequenz im wesentlichen komplementäre Schleifensequenz aufweist; einen an einem Ende des Schleifenabschnitts angeordneten ersten Stielabschnitt mit mindestens drei Nukleosiden; einen am anderen Ende des Schleifenabschnitts angeordneten zweiten Stielabschnitt mit mindestens drei Nukleosiden, wobei die beiden Stielabschnitte intramolekular hybridisieren können; und einen Fluorophor, der an einer Position des ersten Stielabschnitts gebunden ist.

Die Erfindung bezieht sich ferner auf die Verwendung des farbstoffmarkierten Oligonukleotids zum Markieren eines einen Zielsequenz-Abschnitt aufweisenden Nukleinsäuremoleküls in einer Lösung und auf zwei Verfahren zum Nachweisen eines einen Zielsequenz-Abschnitt aufweisenden Nukleinsäuremoleküls in einer Lösung.

Die eingangs genannten farbstoffmarkierten Oligonukleotide werden häufig "Nukleinsäuresonden" genannt. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der schnellen und empfindlichen Detektion spezifischer, bekannter Nukleinsäuremoleküle (DNA oder RNA) in biologischen Proben in der Molekularbiologie und Biotechnologie. Zu speziellen Anwendungen gehören unter anderem die medizinische Früherkennung einer bakteriellen oder viralen Infektion, die Forensik, der Einsatz in der DNA/RNA-Amplifizierung durch PCR oder durch andere Techniken, in der Frühdiagnose eines genetischen Fehlers sowie bei der Diskriminierung zwischen ähnlichen Organismen und Allelen.

Es sind verschiedene Verfahren zur Erkennung und Mengenbestimmung von Nukleinsäuren bekannt. Das weit verbreitete Southern-Blotting-Verfahren zeichnet sich durch zeitraubende Arbeitsschritte und eine schlechte Empfindlichkeit aus.

Ein neueres, elegantes Verfahren zum Nachweisen eines spezifischen Nukleinsäuremoleküls verwendet die sogenannten "Molecular Beacons" (Tyagi et al. 1996, *Nature Biotechnology* 14, 303-308; Kostrikis et al. 1998, *Science* 279, 1228-1229). Molecular Beacons sind farbstoffmarkierte Oligonukleotide, die die eingangs genannte Stiel-Schleifen-Struktur haben. An den beiden freien Enden der Stielabschnitte (dem 3'- und dem 5'-Ende) ist jeweils ein Fluorophor gekoppelt. Der eine Fluorophor dient als Fluoreszenz-Farbstoff und der andere als Quencher-Farbstoff, der die Fluoreszenz des Fluoreszenz-Farbstoffs bei hinreichender räumlicher Nähe durch Förster-Energietransfer löscht.

Die Sequenzen der Stielabschnitte an beiden Enden der Molecular Beacons sind derart gewählt, daß dann, wenn sich der Molecular Beacon faltet, die Stielabschnitte ausschließlich aneinander, nicht aber mit anderen Abschnitten des Oligonukleotids hybridisieren. Im Zustand der hybridisierten Stielabschnitte ist der Abstand zwischen dem Fluoreszenz-Farbstoff und dem Quencher-Farbstoff hinreichend klein, so daß der Fluoreszenz-Farbstoff auch bei geeigneter Anregung mit Licht nicht fluoresziert.

Der Schleifenabschnitt weist eine Sequenz auf, die zur Sequenz des Zielsequenz-Abschnitts komplementär ist. Befinden sich die Molecular Beacons und die Zielsequenz aufweisende DNA/RNA-Moleküle gemeinsam in einer Lösung, so können die Schleifenabschnitte und die Zielsequenz-Abschnitte hybridisieren. Die Sequenzen und Längen der Stiel- und Schleifenabschnitte sind derart gewählt, daß sich der Molecular Beacon unter Lösung der Hybridisierung

der beiden Stielabschnitte entfaltet. Infolge der Entfaltung wird der räumliche Abstand zwischen dem Fluoreszenz-Farbstoff und dem Quencher-Farbstoff stark vergrößert. Der Fluoreszenz-Farbstoff kann dann zur Fluoreszenz angeregt werden.

Beobachtet man kontinuierlich die Fluoreszenz-Intensität des Fluoreszenz-Farbstoffs, so kann ein Anstieg festgestellt werden, wenn die Molecular Beacons die Zielsequenz-Abschnitte der Nukleinsäuremoleküle aufspüren und an diesen hybridisieren. Auf diese Weise können die Nukleinsäuremoleküle quantitativ nachgewiesen werden.

Der Nachteil dieser Art von Molecular Beacons liegt in ihrer relativ aufwendigen Synthese, da das Oligonukleotid sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende spezifisch mit dem Fluoreszenz- bzw. dem Quencher-Farbstoff markiert werden muß.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, den Nachweis eines Nukleinsäuremoleküls mit Hilfe eines farbstoffmarkierten Oligonukleotids zu verbessern.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein farbstoffmarkiertes Oligonukleotid mit den Merkmalen des Anspruchs 1, durch die Verwendung des farbstoffmarkierten Oligonukleotids gemäß Anspruch 10 sowie durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 11 bzw. 12 gelöst.

Die Erfindung geht von der Erkenntnis aus, daß die Fluoreszenz verschiedener Fluorophore durch Nukleoside über einen photoinduzierten Elektronentransfer gelöscht werden kann (Sauer et al. 1995, *J. Fluoresc.* 5, 247-261; Seidel et al. 1996, *J. Phys. Chem.* 100, 5541-5553). Die Effizienz der Fluoreszenzlöschung durch photoinduzierten Elektronentransfer hängt stark vom Abstand zwischen dem Fluorophor und dem Nukleosid ab, d. h. nur bei einem geringen Abstand zwischen Fluorophor und dem geeigneten Nukleosid (in einem Einzel- oder Doppelstrang) tritt eine spürbare Fluoreszenzlöschung auf. Es wurde festgestellt, das beispielsweise ein Guanosin, das mehr als 4 Basen von der Kopplungsstelle des Fluorophors entfernt ist, keinen merklichen Einfluß auf die Fluoreszenzfähigkeit des Fluorophors hat, sofern der Fluorophor nur über einen sehr kurzen Spacer an das zugehörige Nukleosid gebunden ist. Dies gilt sowohl für ein Guanosin im Strang des Fluorophors als auch für solche im gegenüberliegenden Strang.

Bei dem erfindungsgemäßen farbstoffmarkierten Oligonukleotid weist der zweite Stielabschnitt mindestens ein Quencher-Nukleosid auf, welches die Fluoreszenz des Fluorophors bei hinreichender räumlicher Nähe zwischen Fluorophor und Quencher-Nukleosid durch photoinduzierten Elektronentransfer löscht. Die Sequenz des ersten Stielabschnitts und die Position des Fluorophors sind derart gewählt, daß im hybridisierten Zustand der beiden Stielabschnitte eine für eine Fluoreszenzlöschung hinreichende räumliche Nähe zwischen dem Fluorophor und dem Quencher-Nukleosid vorliegt, und daß bei Hybridisierung des Schleifenabschnitts mit dem Zielsequenz-Abschnitt und Auflösung der Hybridisierung der Stielabschnitte keine Fluoreszenzlöschung des Fluorophors auftritt.

Ein solches farbstoffmarkiertes Oligonukleotid (bzw. eine solche Nukleinsäuresonde) hat eine Reihe von Vorteilen. Es wird nur ein einziger Fluorophor benötigt. Dadurch vereinfacht sich die Synthese. Da der Mechanismus der Fluoreszenzlöschung durch photoinduzierten Elektronentransfer genau verstanden ist, kann auch eine gezielte Optimierung der Fluoreszenzlöschung vorgenommen werden.

Für eine effiziente Löschung müssen Nukleosid und Fluorophor aufeinander abgestimmt sein. Von den natürlich vorkommenden Nukleosiden hat Guanosin die stärkste löschende Wirkung auf Rhodamin-Farbstoffe. Die Löscheffizienz kann dadurch erhöht werden, daß 7-Deaza-Guanosin

als Quencher-Nukleosid verwendet wird. In beiden Fällen bietet es sich an, daß alle weiteren Nukleoside des zweiten Stielabschnitts Guanosine sind. Entsprechend können als Nukleoside des ersten Stielabschnitts Cytidine gewählt werden.

Die Sequenz des ersten Stielabschnitts kann derart gewählt werden, daß der erste Stielabschnitt nicht mit einem an den Zielsequenz-Abschnitt angrenzenden Abschnitt des Nukleinsäuremoleküls hybridisieren kann. Andernfalls könnte der Fluorophor des ersten Stielabschnitts in die Nähe eines als Quencher wirkenden Guanosins geraten.

Als weiteres Quencher-Nukleosid kann 7-Deaza-Adenosin verwendet werden. Durch Einsatz von 7-Deaza-Adenosin als Quencher wird der Löscheffekt auf den Fluorophor im Vergleich zum unmodifizierten Guanosin drastisch gesteigert. Wenn 7-Deaza-Adenosin als Quencher-Nukleosid eingesetzt wird, wird das Fluorophor vorteilhafterweise an Thymidin (im Falle von DNA-Molekülen) oder an Uridin (im Falle von RNA-Molekülen) gekoppelt. Diese Nukleoside gehen bei einer Hybridisierung der beiden Stielabschnitte eine Basenpaarung mit dem 7-Deaza-Adenosin ein.

Verwendet man 7-Deaza-Adenosin als Quencher-Nukleosid am zweiten Stielabschnitt und koppelt den Fluorophor an Thymidin oder Uridin, so liegt bei einer Hybridisierung des ersten Stielabschnitts mit einem Abschnitt des Nukleinsäuremoleküls dem Fluorophor im Doppelstrang ein natürliches, unmodifiziertes Adenosin gegenüber. Dieses läßt die Fluoreszenz des Fluorophors im wesentlichen unbeeinflusst. Daher kann eine Hybridisierung des ersten Stielabschnitts mit einem an den Zielsequenz-Abschnitt angrenzenden Abschnitt des Nukleinsäuremoleküls zugelassen werden, sofern die Sequenzen des ersten Stielabschnitts und des Zielsequenz-Abschnitts derart gewählt werden, daß sich kein Guanosin in der Nähe des Fluorophors befindet. Durch die Hybridisierung des ersten Stielabschnitts an einem Abschnitt des Nukleinsäuremoleküls befindet sich das Fluorophor in einer wohldefinierten Umgebung. Unkontrollierbare Hybridisierungen mit anderen Nukleinsäuremolekülen in der Lösung werden dadurch vermieden.

Guanosin, 7-Deaza-Guanosin und 7-Deaza-Adenosin können auch gemischt im zweiten Stielabschnitt verwendet werden.

Eine besonders einfache Synthese des farbstoffmarkierten Oligonukleotids kann dann erreicht werden, wenn der erste Stielabschnitt am 5'-Ende des Schleifenabschnitts angeordnet ist und der Fluorophor terminal am endständigen Nukleosid gekoppelt ist.

Eine weitere vorteilhafte Möglichkeit eröffnet sich, wenn der erste Stielabschnitt am 3'-Ende des Schleifenabschnitts angeordnet ist, der Fluorophor terminal am endständigen Nukleosid des ersten Stielabschnitts gekoppelt ist und das 5'-Ende des zweiten Stielabschnitts für eine Immobilisierung funktionalisiert ist. Auf diese Weise können die Nukleinsäuresonden z. B. auf einem DNA-Chip immobilisiert werden. Letzterer kann eine Hybridisierung durch ein Fluoreszenzsignal anzeigen.

Das 5'-Ende des zweiten Stielabschnitts kann mit einem Acrylamid-Molekül funktionalisiert werden. Eine solcherart funktionalisierte Nukleinsäuresonde kann bei der Herstellung eines Polyacrylamidgels durch Copolymerisation immobilisiert werden. Dies kann an einer bestimmten Position in einem Plattengel oder einer Kapillare erfolgen. Eine zu untersuchende Probe, die Nukleinsäuremoleküle mit den unterschiedlichsten Sequenzen enthalten kann, wird dann unter nicht-denaturierenden Bedingungen im Gel aufgetrennt. Das Vorhandensein eines den Zielsequenz-Abschnitt aufweisenden Nukleinsäuremoleküls zeigt sich durch ein entsprechendes Signal an der Position der immobilisierten

Nukleinsäuresonde in Gel. Anschließend kann das den Zielsequenz-Abschnitt aufweisende Nukleinsäuremolekül z. B. durch Ausschneiden aus dem Plattengel gezielt isoliert werden.

Der Schleifenabschnitt muß lang genug sein, um bei Hybridisierung mit dem Zielsequenz-Abschnitt die Hybridisierung der beiden Stielabschnitte aufzulösen. Er muß andererseits aber nur genau so lang sein, daß eine eindeutige Identifizierung des Zielsequenz-Abschnitts gegeben ist. Vorteilhafterweise umfaßt daher der Schleifenabschnitt 8 bis 50 Nukleoside.

Die beiden Stielabschnitte müssen mindestens so lang sein, daß eine zuverlässige Hybridisierung auftreten kann. Andererseits sollte die Hybridisierung der beiden Stielabschnitte jedoch im Falle der Hybridisierung des Schleifenabschnitts mit dem Zielsequenz-Abschnitt aufgelöst werden. Die Stärke der Hybridisierung läßt sich durch die Länge der beiden Stielabschnitte beeinflussen. Vorteilhafterweise umfaßt daher der erste Stielabschnitt 3 bis 8 Nukleoside und der zweite Stielabschnitt mindestens so viele Nukleoside wie der erste Stielabschnitt.

Als Fluorophore eignen sich prinzipiell alle bekannten Farbstoffmoleküle, speziell aber Rhodamin- und Phenoxazin-Farbstoffe. Letztere sind gut koppelbar und photostabil. Ein weiterer Vorteil des Einsatzes von Rhodamin- oder Phenoxazin-Farbstoffen besteht darin, daß als Anregungslichtquelle für eine Fluoreszenzdetektion kleine und billige Diodenlaser eingesetzt werden können.

Das erfindungsgemäße farbstoffmarkierte Oligonukleotid kann vorteilhaft zum Markieren eines einen Zielsequenz-Abschnitt aufweisenden Nukleinsäuremoleküls in einer Lösung verwendet werden, wobei das farbstoffmarkierte Oligonukleotid mit dem Nukleinsäuremolekül hybridisiert.

Das erfindungsgemäße farbstoffmarkierte Oligonukleotid ist außerdem besonders zum Nachweis eines einen Zielsequenz-Abschnitt aufweisenden Nukleinsäuremoleküls in einer Lösung geeignet. Dazu wird das Nukleinsäuremolekül mit einem erfindungsgemäßen farbstoffmarkierten Oligonukleotid markiert. Zur Stabilisierung des Doppelstrangs aus Sonde und Nukleinsäuremolekül und zur Verbesserung der Löscheffizienz zwischen Quencher und Fluorophor wird nach der Hybridisierung und vor der Aufnahme eines Nachweissignals der pH-Wert der Lösung auf Werte zwischen 2 und 4 eingestellt. Um zu vermeiden, daß sich Intensitätsschwankungen, beispielsweise aufgrund von Inhomogenitäten der Lösung, auf die Meßergebnisse auswirken, kann die Fluoreszenz des Fluorophors derart angeregt und detektiert werden, daß dessen Fluoreszenzabklingverhalten erfaßt wird.

Vorteilhafte Weiterbildungen der Erfindung sind in den Unteransprüchen gekennzeichnet.

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert, die in den Figuren schematisch dargestellt sind. Gleiche Bezugswerte in den einzelnen Figuren bezeichnen dabei gleiche Elemente. Im einzelnen zeigen:

Fig. 1 ein farbstoffmarkiertes Oligonukleotid, bei dem die Stielabschnitte aneinander hybridisiert sind;

Fig. 2 das farbstoffmarkierte Oligonukleotid gemäß **Fig. 1**, wobei der Schleifenabschnitt an einem Nukleinsäuremolekül hybridisiert ist;

Fig. 3 ein zweites Ausführungsbeispiel eines farbstoffmarkierten Oligonukleotids, bei dem die Stielabschnitte aneinander hybridisiert sind;

Fig. 4 das farbstoffmarkierte Oligonukleotid gemäß **Fig. 3**, wobei der Schleifenabschnitt an einem Nukleinsäuremolekül hybridisiert ist; und

Fig. 5 ein drittes Ausführungsbeispiel eines farbstoffmar-

kierten Oligonukleotids, bei dem die Stielabschnitte aneinander hybridisiert sind;

Fig. 6 das farbstoffmarkierte Oligonukleotid gemäß **Fig. 5**, wobei der Schleifenabschnitt an einem Nukleinsäuremolekül hybridisiert ist; und

Fig. 7 eine schematische Darstellung der möglichen Zustandsänderungen beim photoinduzierten Elektronentransfer.

In den Figuren bezeichnen die Buchstaben A, C, G und T die Nukleoside Adenosin, Cytidin, Guanosin und Thymidin.

Im folgenden sei der photoinduzierte Elektronentransfer anhand von **Fig. 7** kurz erläutert. Dargestellt ist die Fluoreszenzlöschung eines angeregten Farbstoff-Moleküls F^* durch eine Nukleosid N. Die schwarzen Kreise repräsentieren Elektronen. Es sind jeweils das HOMO (highest occupied molecular orbital) und das LUMO (lowest unoccupied molecular orbital) eingezeichnet. Das HOMO ist das energetisch höchste, im elektronischen Grundzustand besetzte Molekülorbital. Das LUMO ist das energetisch niedrigste, im elektronischen Grundzustand unbesetzte Molekülorbital; es ist i.d.R. das Molekülorbital, das im ersten angeregten Zustand besetzt wird.

Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten der Fluoreszenzlöschung durch photoinduzierten Elektronentransfer. Im in **Fig. 7** links dargestellten Fall wirkt das Nukleosid N als Elektronenspender (Donor). Nach Anregung des Fluorophors F^* geht ein Elektron vom doppelt besetzten HOMO des Nukleosids zum nun einfach besetzten HOMO des Fluorophors F^* über (1). Es kommt zu einer Reduktion des angeregten Fluorophors F^* durch das Nukleosid N. Das Elektron im LUMO des Fluorophors kann anschließend zum nun einfach besetzten HOMO des Nukleosid N übergehen (2). Dieser Fall tritt zwischen Guanosin und Rhodamin-Molekülen auf.

Im in **Fig. 7** rechts dargestellten Fall wirkt das Nukleosid N als Elektronenakzeptor (Akzeptor). Aus dem einfach besetzten LUMO des angeregten Fluorophors F^* geht das dort befindliche Elektron zum unbesetzten LUMO des Nukleosids N über (3). Es kommt zu einer Oxidation des angeregten Fluorophors F^* durch das Nukleosid N. Das Elektron im LUMO des Nukleosids kann anschließend zum HOMO des Fluorophors zurückkehren (4).

In beiden Fällen kann das Elektron nach dem Elektronentransfer nicht mehr aus dem LUMO des angeregten Fluorophors F^* durch Aussenden eines Photons in das HOMO zurückkehren. Der erste angeregte Zustand wurde strahlungslos deaktiviert. Die Fluoreszenz ist gelöscht.

Fig. 1 zeigt ein Oligonukleotid **10**, an dessen einem Ende ein Fluorophor **12** gekoppelt ist. Das Oligonukleotid **10** besteht aus einem ersten Stielabschnitt **14**, einem zweiten Stielabschnitt **16** und einem Schleifenabschnitt **18**. Die Sequenz des ersten Stielabschnitts **14** besteht aus 6 Nukleosiden, die alle Cytidine sind. Die Sequenz des zweiten Stielabschnitts **16** besteht aus mindestens 6 Guanosinen.

Dadurch können der erste Stielabschnitt **14** und der zweite Stielabschnitt **16** aneinander hybridisieren und das Oligonukleotid **10** in eine Stiel-Schleifen-Struktur falten. Die genaue Länge des zweiten Stielabschnitts ist unerheblich, sofern er mindestens so viele Nukleoside aufweist, wie der erste Stielabschnitt.

Im folgenden wird auf **Fig. 2** Bezug genommen. Die Sequenz des Schleifenabschnitts **18** ist derart gewählt, daß das Oligonukleotid **10** als Sonde für ein spezifisches Nukleinsäuremolekül **20** dienen kann. In der Regel ist die Schleifensequenz komplementär zur Sequenz eines Zielabschnitts des Nukleinsäuremoleküls **20**. Werden das Oligonukleotid **10** und das Nukleinsäuremolekül **20** zusammen in eine Lösung gegeben, so hybridisiert der Schleifenabschnitt **18** am Ziel-

sequenz-Abschnitt des Nukleinsäuremoleküls **20**. Dadurch löst sich die Hybridisierung zwischen den beiden Stielabschnitten **14**, **16**. Infolgedessen vergrößert sich der Abstand zwischen dem Fluorophor **12** und den Guanosinen des zweiten Stielabschnitts **16**. Letztere wirken nicht mehr fluoreszenzlöschend auf den Fluorophor **12**, dessen Fluoreszenz somit beobachtet werden kann. Ein Anstieg der Fluoreszenz des Fluorophors **12** erlaubt daher qualitative und quantitative Aussagen über das Vorliegen des Nukleinsäuremoleküls **20**.

Der Zielsequenz-Abschnitt auf dem Nukleinsäuremolekül **20** wird bei diesem Ausführungsbeispiel derart gewählt, daß der erste Stielabschnitt **14** bei Hybridisierung des Schleifenabschnitts **18** nicht mit dem Nukleinsäuremolekül **20** hybridisiert. Dadurch wird die Nähe zu irgendwelchen Guanosinen auf diesem Abschnitt des Nukleinsäuremoleküls **20** prinzipiell vermieden. In **Fig. 2** erkennt man jedoch, daß der zweite Stielabschnitt **16** beispielsweise teilweise auf dem Nukleinsäuremolekül hybridisieren kann.

Im folgenden wird auf **Fig. 3** Bezug genommen. **Fig. 3** zeigt ein zweites Ausführungsbeispiel eines farbstoffmarkierten Oligonukleotids **10**, das im wesentlichen mit dem Oligonukleotid gemäß **Fig. 1** übereinstimmt. Das Oligonukleotid gemäß **Fig. 3** weist jedoch im ersten Stielabschnitt **14** als fünftes Nukleosid – gezählt vom Ende her – ein Thymidin auf. Der zweite Stielabschnitt weist als neuntes Nukleosid – ebenfalls vom Ende her gezählt – ein Adenosin auf. Im hybridisierten Doppelstrang kommt es zwischen dem Adenosin und dem Thymidin zur Basenpaarung. Die Cytidine und Guanosine können dann nicht gegeneinander versetzt hybridisieren. Dadurch ist gewährleistet, daß an einem Ende ein Guanosin-Überstand resultiert, der die Löschung des Fluorophors begünstigt.

Fig. 4 zeigt das Oligonukleotid **10** gemäß **Fig. 3** an einem Nukleinsäuremolekül **20** hybridisiert, das einen Zielsequenz-Abschnitt aufweist, dessen Sequenz komplementär zur Schleifensequenz ist.

Im folgenden wird auf **Fig. 5** Bezug genommen. **Fig. 5** zeigt ein zweites Ausführungsbeispiel eines farbstoffmarkierten Oligonukleotids **22** mit einem ersten Stielabschnitt **24** und einem zweiten Stielabschnitt **26**. Der zweite Stielabschnitt **26** weist genau 6 Nukleoside auf, von denen das endständige Nukleosid ein modifiziertes Adenosin ist, genauer gesagt 7-Deaza-Adenosin. Dies ist in den **Fig. 5** und **6** mit A' bezeichnet. Entsprechend befindet sich an der im hybridisierten Zustand der beiden Stielabschnitte **24**, **26** dem 7-Deaza-Adenosin gegenüberliegenden Stelle des ersten Stielabschnitts **24** ein Thymidin. An das Thymidin ist der Fluorophor **12** gekoppelt.

Fig. 6 zeigt das Nukleinsäuremolekül **20** gemäß **Fig. 2**, an welches das als Sonde dienende farbstoffmarkierte Oligonukleotid **22** gemäß **Fig. 5** hybridisiert ist. Die **Fig. 2** und **6** unterscheiden sich nur dahingehend, daß die Stielabschnitte **14**, **16** bzw. **24**, **26** unterschiedliche Sequenzen aufweisen. Der erste Stielabschnitt **24** hat in den **Fig. 5** und **6** eine Sequenz, die eine Hybridisierung des ersten Stielabschnitts **24** mit einem an den Zielsequenz-Abschnitt angrenzenden Abschnitt des Nukleinsäuremoleküls **20** ermöglicht.

Der Zielsequenz-Abschnitt und die zugehörige Sequenz des Oligonukleotids **22** können in der folgenden Weise bestimmt werden:

- a) Auf dem Nukleinsäuremolekül **20** wird ein Adenosin gesucht, bei dem sich unter den jeweils 4, links und rechts benachbarten Nukleosiden weder Cytidin noch Guanosin befindet.
- b) In Verlängerung dieses Adenosins z. B. in 5'-Richtung des Nukleinsäuremoleküls **20** um mindestens 9

Nukleoside wird eine Sequenz gesucht, die das Nukleinsäuremolekül **20** eindeutig kennzeichnet.

c) Die Oligonukleotidsequenz **22** wird zu dieser Sequenz komplementär gebildet. Dabei bilden die ersten 3 bis 6 Nukleoside am 5'-Ende der Oligonukleotidsequenz die erste Stielsequenz **24**.

d) Die zweite Stielsequenz **26** wird auf die folgende Weise gewonnen: Es wird geprüft, ob es am 3'-Ende der Oligonukleotidsequenz

da) 3 bis 6 intramolekular ausschließlich zur ersten Stielsequenz komplementäre Nukleoside gibt, und ob

db) das 3'-terminale Nukleosid Adenosin ist.

Ist dies der Fall, so bilden diese 6 Nukleoside die zweite Stielsequenz **26**.

Ist dies nicht der Fall, so wird die Oligonukleotidsequenz um 3 bis 6 Nukleoside derart verlängert, daß sich 3 bis 6 intramolekular ausschließlich zur ersten Stielsequenz komplementäre Nukleoside mit 3'-terminalem Adenosin ergeben. (Sollte dies nicht möglich sein, da sich z. B. die Sequenz des ersten Stielabschnitts innerhalb der Zielsequenz wiederholt, muß ein anderes Adenosin gemäß Schritt a) gesucht werden.)

Das 3'-terminale Adenosin wird bei der Synthese des Oligonukleotids durch 7-Deaza-Adenosin ersetzt.

(Die minimale Zahl von 9 Nukleosiden in Schritt b) ergibt sich aus der minimalen Länge der Oligonukleotidsequenz bestehend aus 3 Nukleosiden für die beiden Stielsequenzen **24**, **26** und mindestens 4 Nukleosiden für den Faltungsabschnitt des Oligonukleotids.)

Man sieht an diesem Beispiel, daß sich die Schleifen- und Stielabschnitte auch überlappen können, und daß das farbstoffmarkierte Oligonukleotid **22** auch vollständig auf dem Nukleinsäuremolekül **20** hybridisieren kann.

Prinzipiell kann der Farbstoff sowohl an das 3'-Ende als auch an das 5'-Ende des Oligonukleotids gekoppelt werden. Hierzu stehen die folgenden Möglichkeiten zur Verfügung:

(a) bekannte Modifikation eines Endes des Oligonukleotids mit einer Aminfunktion, z. B. durch einen C6-Aminolinker, und anschließende Ankopplung des Farbstoffs an das modifizierte Ende über eine aktivierte Carboxylfunktion.

(b) synthetischer Einbau eines aminomodifizierten Nukleotids beim Aufbau des Oligonukleotids, z. B. in einem Synthesizer, und anschließende Ankopplung des Farbstoffs an das aminomodifizierte Nukleotid über eine aktivierte Carboxylfunktion.

(c) synthetischer Einbau des Farbstoffs als Phosphoramidit während der Oligonukleotid-Synthese.

Zur Optimierung der Löscheffizienz muß einerseits der durch die Hybridisierung gebildete Doppelstrang möglichst stabil sein. Dies wird in bekannter Weise durch Einstellen geeigneter Salzkonzentrationen erreicht. Andererseits kann aber auch der pH-Wert einen drastischen Einfluß auf die Löscheffizienz haben, etwa bei Verwendung eines Rhodamin-Farbstoffs, der eine freie Carboxylgruppe trägt, z. B. Tetramethylrhodamin. Durch die Protonierung der freien Carboxylfunktion im sauren Medium wird die Abstoßung zwischen dem Farbstoff und den Phosphatgruppen der Nukleotide verringert. Letzteres führt zu einem geringeren Abstand zwischen Farbstoff und Nukleotiden bzw. Nukleosiden und damit zu einer stärkeren Fluoreszenzlöschung. Bei Verwendung geeigneter Farbstoffe wird daher der pH-Wert vor Aufnahme eines Nachweissignals auf ca. 3 eingestellt.

Zum Nachweis des Nukleinsäuremoleküls wird die Fluoreszenz des Fluorophors vorzugsweise mit zeitkorreliertem Einzelphotonenzählen nachgewiesen (D.V. O'Connor und D. Phillips, "Time-correlated single photon counting", Academic Press, London, 1984). Neben der besonders hohen Empfindlichkeit bietet diese spektroskopische Technik den Vorteil, daß mit ihrer Hilfe das Fluoreszenzabklingverhalten des Fluorophors **12** beobachtet werden kann. Dieses hat sich als verlässlicheres Kriterium zum Nachweis der Fluoreszenz des Fluorophors **12** und damit des Nukleinsäuremoleküls **20** erwiesen als eine einfache Intensitätsmessung. Intensitätsschwankungen, beispielsweise aufgrund von Inhomogenitäten der Lösung, wirken sich dadurch nicht auf die Meßergebnisse aus.

Im Rahmen der Erfindung sind zahlreiche Abwandlungen und Weiterbildungen der beschriebenen Ausführungsbeispiele verwirklicht. So muß beispielsweise der Fluorophor **12** nicht unmittelbar an demjenigen Nukleosid gekoppelt sein, das dem Quencher-Nukleosid im hybridisierten Zustand gegenüberliegt. Der Abstand zum ersten genannten Nukleosid muß nur hinreichend klein sein, um eine brauchbare Fluoreszenzlöschung durch das Quencher-Nukleosid hervorzurufen. Auch müssen der Schleifenabschnitt **18** und die Stielabschnitte **14**, **16**, **24**, **26** nicht unmittelbar aneinander grenzen. Sie können durch weitere, kurze Sequenzabschnitte voneinander getrennt sein. Die Sequenz des Stielabschnitts und damit die komplementäre Sequenz des Schleifenabschnitts **18** sind prinzipiell beliebig. Außerdem kann das Nukleinsäuremolekül **20** ausschließlich aus dem Zielsequenz-Abschnitt bestehen.

Patentansprüche

1. Farbstoffmarkiertes Oligonukleotid zum Markieren eines einen Zielsequenz-Abschnitt aufweisenden Nukleinsäuremoleküls, wobei das farbstoffmarkierte Oligonukleotid folgende Komponenten aufweist:

- einen Schleifenabschnitt, der eine zur Zielsequenz im wesentlichen komplementäre Schleifensequenz aufweist;

- einen an einem Ende des Schleifenabschnitts angeordneten ersten Stielabschnitt mit mindestens drei Nukleosiden;

- einen am anderen Ende des Schleifenabschnitts angeordneten zweiten Stielabschnitt mit mindestens drei Nukleosiden, wobei die beiden Stielabschnitte aneinander hybridisieren können; und

- einen Fluorophor, der an einer Position des ersten Stielabschnitts gebunden ist;

dadurch gekennzeichnet,

daß der zweite Stielabschnitt mindestens ein Quencher-Nukleosid aufweist, welches die Fluoreszenz des Fluorophors bei hinreichender räumlicher Nähe zwischen Fluorophor und Quencher-Nukleosid durch photoinduzierten Elektronentransfer löscht;

wobei die Sequenz des ersten Stielabschnitts und die Position des Fluorophors derart gewählt sind, daß im hybridisierten Zustand der beiden Stielabschnitte eine für eine Fluoreszenzlöschung hinreichende räumliche Nähe zwischen dem Fluorophor und dem Quencher-Nukleosid vorliegt, und daß bei Hybridisierung des Schleifenabschnitts mit dem Zielsequenz-Abschnitt und Auflösung der Hybridisierung der Stielabschnitte keine Fluoreszenzlöschung des Fluorophors auftritt.

2. Farbstoffmarkiertes Oligonukleotid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Quencher-Nukleosid Guanosin oder 7-Deaza-Guanosin oder

7-Deaza-Adenosin ist.

3. Farbstoffmarkiertes Oligonukleotid nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der erste Stielabschnitt derart gewählt ist, daß bei Hybridisierung des Schleifenabschnitts mit dem Zielsequenz-Abschnitt des Nukleinsäuremoleküls auch der erste Stielabschnitt mit einem Abschnitt des Nukleinsäuremoleküls hybridisiert.

4. Farbstoffmarkiertes Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der erste Stielabschnitt am 5'-Ende des Schleifenabschnitts angeordnet ist; und daß der Fluorophor terminal am endständigen Nukleosid des ersten Stielabschnitts gekoppelt ist.

5. Farbstoffmarkiertes Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der erste Stielabschnitt am 3'-Ende des Schleifenabschnitts angeordnet ist; und daß der Fluorophor terminal am endständigen Nukleosid des ersten Stielabschnitts gekoppelt ist; und daß das 5'-Ende des zweiten Stielabschnitts für eine Immobilisierung funktionalisiert ist.

6. Farbstoffmarkiertes Oligonukleotid nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das 5'-Ende des zweiten Stielabschnitts mit einem Acrylamid-Molekül funktionalisiert ist.

7. Farbstoffmarkiertes Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Schleifenabschnitt 8 bis 50 Nukleoside umfaßt.

8. Farbstoffmarkiertes Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der erste Stielabschnitt maximal 8 Nukleoside umfaßt.

9. Farbstoffmarkiertes Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Fluorophor ein Rhodamin- oder Phenoxazin-Farbstoffmolekül aufweist.

10. Verwendung des farbstoffmarkierten Oligonukleotids nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zum Markieren eines Zielsequenz-Abschnitt aufweisenden Nukleinsäuremoleküls in einer Lösung, wobei das farbstoffmarkierte Oligonukleotid mit dem Nukleinsäuremolekül hybridisiert.

11. Verfahren zum Nachweisen eines Zielsequenz-Abschnitt aufweisenden Nukleinsäuremoleküls in einer Lösung, wobei zum Markieren des Nukleinsäuremoleküls das Verfahren nach Anspruch 10 ausgeführt wird; und wobei nach der Hybridisierung und vor der Aufnahme eines Nachweissignals der pH-Wert der Lösung auf Werte zwischen 2 und 4 eingestellt wird.

12. Verfahren zum Nachweisen eines Zielsequenz-Abschnitt aufweisenden Nukleinsäuremoleküls in einer Lösung, wobei zum Markieren des Nukleinsäuremoleküls das Verfahren nach Anspruch 10 ausgeführt wird; und wobei danach die Fluoreszenz des Fluorophors derart angeregt und detektiert wird, daß dessen Fluoreszenzabklingverhalten erfaßt wird.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

60

65

Fig. 1

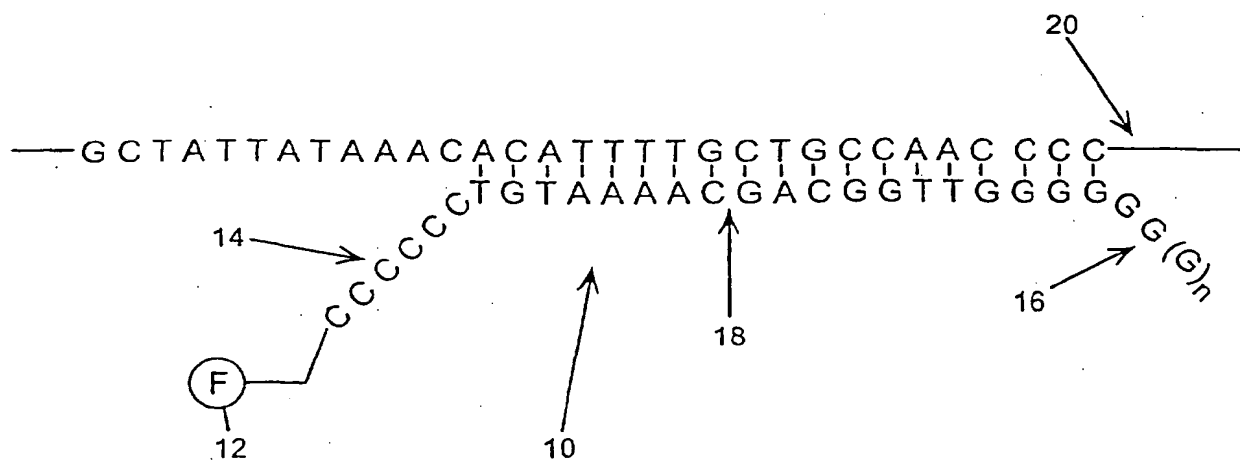
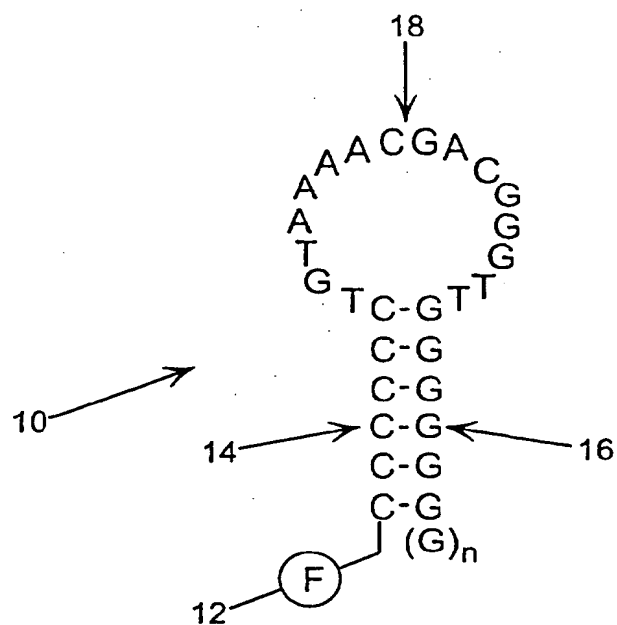


Fig. 2

Fig. 3

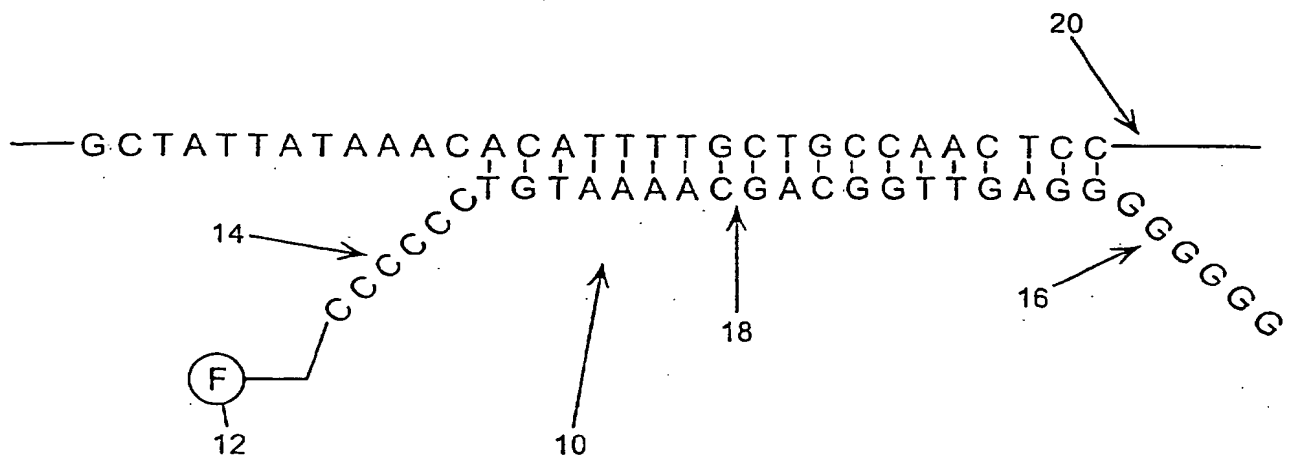
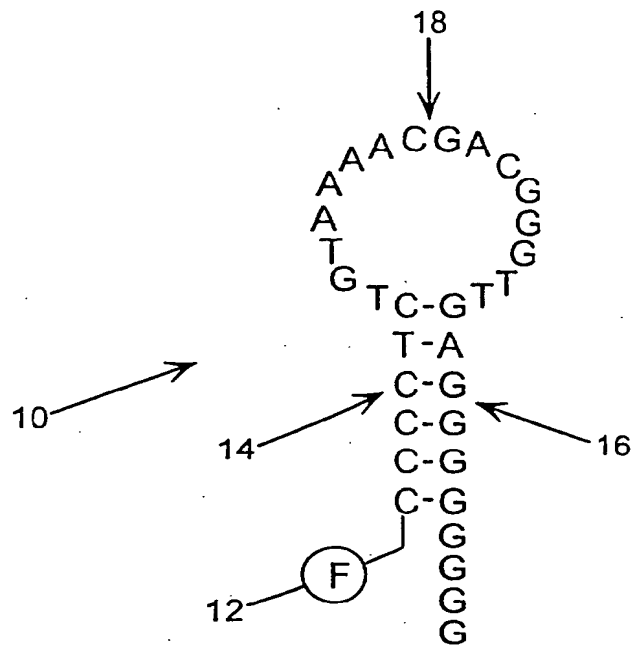


Fig. 4

Fig. 5

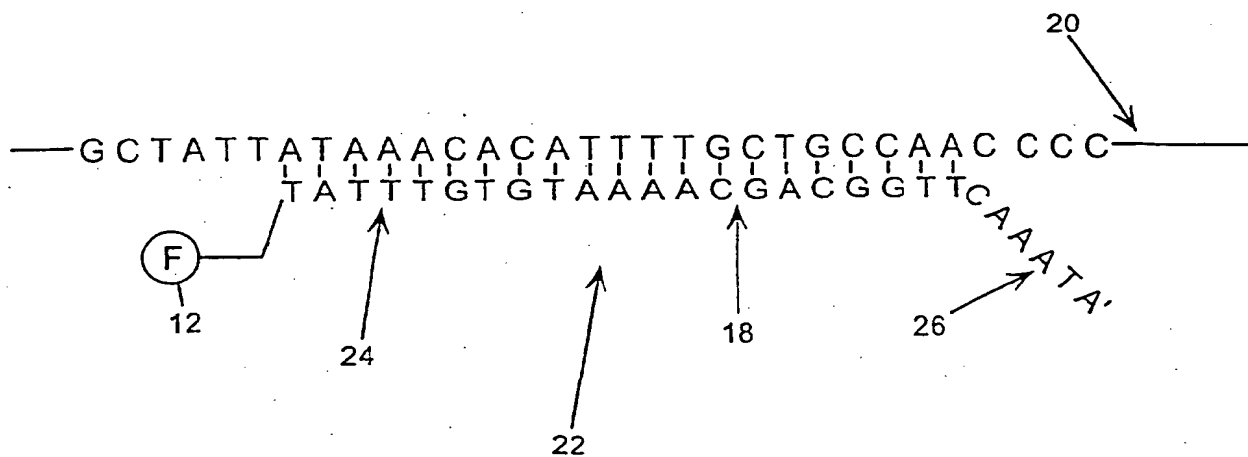
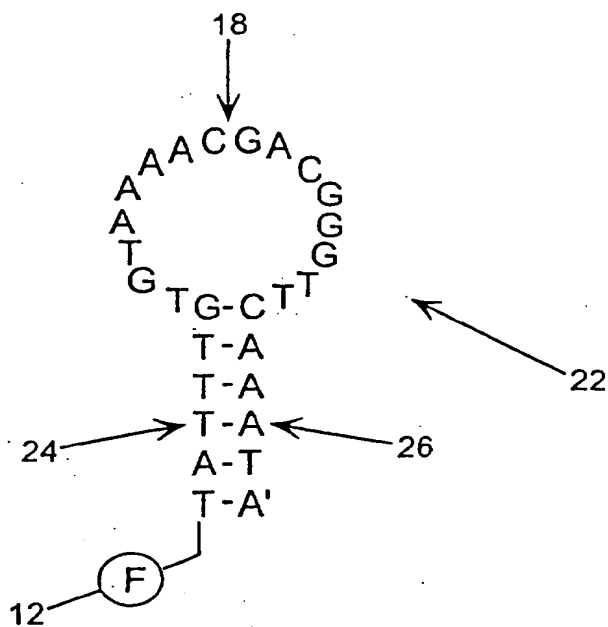


Fig. 6

Fig. 7

